

Partial Translation of Japanese Laid-Open Patent Publication No. 10-33194

Date of Laid-Open: February 10, 1998

Application No. 8-214053

Filing date: July 26, 1996

Applicant: Takara Shuzo Co., Ltd.

Inventors: Hiroshi Ohnogi et al.

Title of the Invention:

A method for producing a saccharide or a glycoconjugate

Claims:

1. A method for producing a saccharide or a glycoconjugate comprising carrying out a transfer reaction represented by the following formula (1) in the presence of a glycosidase which specifically acts on lacto-N-bioside linkage in a type 1 sugar chain structure:



in which Gal represents galactose, GlcNAc represents N-acetylglucosamine, X represents a saccharide, a glycoconjugate, or a chemical substance which can become an aglycon, and Y represents a saccharide or a glycoconjugate.

2. The method of claim 1, wherein the glycosidase is lacto-N-biosidase.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-33194

(43) 公開日 平成10年(1998) 2月10日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 19/18			C 1 2 P 19/18	
C 0 7 H 1/00			C 0 7 H 1/00	

審査請求 未請求 請求項の数 3 F D (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平8-214053

(22) 出願日 平成 8 年(1996) 7 月26日

(71) 出願人 591038141

實酒造株式会社

京都府京都市伏見区竹中町609番地

(72) 発明者 大野木 宏

滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 實酒造
株式会社中央研究所内

(72) 発明者 佐野 睦

滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 實酒造
株式会社中央研究所内

(72) 発明者 近藤 昭宏

滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 實酒造
株式会社中央研究所内

(74) 代理人 弁理士 中本 宏 (外 2 名)

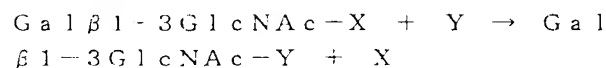
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 糖質又は複合糖質の製造方法

(57) 【要約】

【課題】 タイプ 1 型糖鎖を特異的に、かつ簡便に付加するリモデリング反応、該反応を利用した簡便な糖質又は複合糖質の製造方法を提供する。

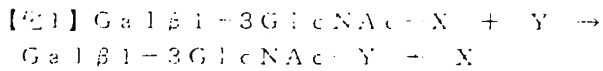
【解決手段】 タイプ 1 型糖鎖構造のラクトー N-ビオシド結合のみに特異的に作用するグリコシダーゼの存在下、下記式 (化 1) :



(式中 X は糖質、複合糖質、若しくはアグリコンとなりうる化学物質、Y は糖質又は複合糖質を示す) で表される転移反応を行う糖質又は複合糖質の製造方法。該方法により得た糖質又は複合糖質。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 タイプ1型糖鎖構造のラクトーN-ビオシド結合のみに特異的に作用するグリコシダーゼの存在を、下記式(化1)：



(式中Galはガラクトース、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン、Xは糖質、複合糖質、若しくはアグリコンとなりうる化学物質、Yは糖質又は複合糖質を示す)で表される転移反応を行うことを特徴とする糖質又は複合糖質の製造方法。

【請求項2】 グリコシターセカラクトーN-ビオシダーゼである請求項1記載の糖質又は複合糖質の製造方法。

【請求項3】 請求項1又は請求項2に記載の製造方法により得られた糖質又は複合糖質。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、糖鎖工学又は医薬分野等に有用な、酵素の糖質転移能を利用した、リモデリングした糖質又は複合糖質の製造方法、並びに該製造方法により得られた糖質又は複合糖質に関する。

【0002】

【従来の技術】糖質及び複合糖質(糖タンパク質、糖脂質、プロテオグリカン等)は、生物の細胞、体液、果実、種や、微生物の細胞又はその培養液中に存在し、それら生体内で様々な重要な生理活性に関与しているということが知られている。それ故に、近年、その生理活性を医薬品として利用しようという試みが盛んに行われている。更に、糖質及び複合糖質の糖鎖の修飾、又は置換を行い、その生理活性を改変し新しいタイプの医薬を創製しようという試みも行われている。糖質及び複合糖質の糖鎖の修飾、又は置換を行うには化学的方法と酵素的方法がある。これらの方法のうち酵素的方法が、タンパク質の変性を起こすことのない緩衝液等の水溶液中で実施可能であり、また酵素が特異的に作用するという点で利用されている。現在広く利用されているリモデリングの手法は、ヨーロッパジャーナル オブ バイオケミストリー (European Journal of Biochemistry)、第191巻、第75～83頁(1990)に記載されているように、エキソグリコシダーゼ又はグリコシルトランスフェラーゼを用いた糖鎖の非還元末端からの逐次変換である。また、エンドグリコシダーゼを用いた糖転移反応の報告は、ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (Journal of Biological Chemistry)、第261巻、第12000～12005頁(1986)に記載のアサノクテリウム・メニコセプチウム (Flavobacterium meningosepticum) 由来のエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼD(エンド-F)に関するものと、ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー

、第264巻、第19893～19897頁(1989)に記載のディプロコッカス・ニューモニエ (Diplococcus pneumoniae) 由来のエンド-α-N-アセチルガラクトサミニダーゼに関するものがある。前者はグリセロールがアクセプターとなるという報告であり、後者はグリセロール、トリマ、p-ニトロフェノール、セリン、スレオニンがアクセプターとなるという報告である。一方、糖質や複合糖質が直接アクセプターとなる糖鎖のリモデリング機構の報告としては、特開平5-64594号公報に記載のアスロバクター・プロトホルミエ (Arthrobacter protophormiae) 由来のエント-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ(エンド-A)に関するものと、特開平7-59587号公報に記載のエント-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ(エンド-M)に関するものがある。前述のように、糖鎖をリモデリングした複合糖質の安定性や生理活性が天然の複合糖質に比べて増強されれば、医薬品に応用した場合、非常に有利である。また糖鎖において、その非還元末端にタイプ1型のGalβ1-3GlcNAc構造及びタイプ2型のGalβ1-4GlcNAc構造の2種類の構造がしばしば見出される。それらの糖鎖構造と機能の解析を行う上で、該糖鎖構造を糖加水分解酵素によって除いたり、逆に糖転移酵素によって付加するといった糖鎖リモデリング手法は極めて有用である。しかしながら、従来のエキソグリコシターゼ又はグリコシルトランスフェラーゼを用いたリモデリングの手法では、糖残基1つ1つについて酵素反応を行う必要があり、反応ステップが多くなり大変煩雑である。また、前述のエンドFやディプロコッカス・ニューモニエ由来のエンド-α-N-アセチルガラクトサミニダーゼを用いた糖転移反応の場合も、糖質や複合糖質がアクセプターとなるものではない。一方、エンド-Aやエンド-Mを用いる糖転移反応は、糖質や複合糖質が直接アクセプターとなる糖鎖のリモデリング反応であり、現在、最も簡便で実用的な糖鎖のリモデリング方法である。しかしながら、これらは糖鎖において、その非還元末端のタイプ1型糖鎖構造又はタイプ2型糖鎖構造を特異的にリモデリングすることはできない。

【0003】本発明者らは以前タイプ1型糖鎖構造に特異的に作用しラクトーN-ビオスを遊離させる酵素、ラクトーN-ビオシダーゼを見出している(プロシーディングス オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンシズ オブ ユニオン S A (Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.))、第89巻、第8512～8516頁(1992)、ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー、第268巻、第18560～18566頁(1993))。この酵素の特異性により糖鎖中のタイプ1型構造とタイプ2型構造を識別することからできるようになり、構造解析が極めて容易になった。しかしながら、糖質及び複合糖質

にタイプ1型糖鎖構造及びタイプ2型糖鎖構造を付加させることは容易ではない。いままでのところは厳密な転移特異性を示す2種の糖転移酵素の作用、つまり、 β -N-アセチルグルコサミルトランスフェラーゼの働きに続き、 β -1,3及び β -1,4ガラクトシルトランスフェラーゼの働きを用いる方法が知られている。

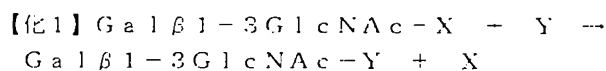
【0004】

【発明が解決しようとする課題】前述のように、酵素法を用いた糖鎖のリモデリングは、反応条件が温和なことなどから有用性が高い。しかしながら、従来のエキソグリコシターゼやエンドグリコシダーゼでは、タイプ1型糖鎖を特異的に、しかも簡便に付加させることはできず、また β -N-アセチルグルコサミルトランスフェラーゼと β -1,3ガラクトシルトランスフェラーゼを用いる方法は、反応条件の設定や反応ステップが多くなり大変煩雑になるなどの問題から極めて困難であった。本発明の目的は、タイプ1型糖鎖を特異的に、かつ簡便に付加するリモデリング反応、該反応を利用した簡便な糖質又は複合糖質の製造方法を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明を概説すれば、本発明の第1の発明は糖質又は複合糖質の製造方法に関する発明であって、タイプ1型糖鎖構造のラクトーN-ビオシド結合のみに特異的に作用するグリコシダーゼの存在下、下記式(化1)：

【0006】



【0007】(式中Galはガラクトース、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン、Xは糖質、複合糖質、若しくはアグリコンとなりうる化学物質、Yは糖質又は複合糖質を示す)で表される転移反応を行うことを特徴とする。また、本発明の第2の発明は、本発明の第1の発明の製造方法により得られた糖質又は複合糖質に関する。

【0008】本発明者らは、タイプ1型糖鎖を特異的に、かつ1段階の反応で転移を行えることが期待できるグリコシターゼを用いて、糖質及び複合糖質に糖鎖を転移させ、従来の安定性及び活性が増強された新規糖質及び複合糖質の製造をすべく、鋭意研究したところ、タイプ1型糖鎖構造を特異的に認識し糖質及び複合糖質へ転移を行う活性を有するグリコシターゼを見出し、その反応方法を更に研究した結果、本発明を完成した。本発明は、タイプ1型糖鎖構造のラクトーN-ビオシド結合のみに特異的に作用するグリコシターゼを用いて、糖質及び複合糖質の糖鎖をリモデリングすることを特徴とする糖質及び複合糖質の製造方法である。

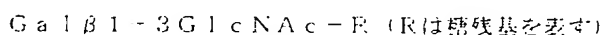
【0009】

【発明の実施の形態】以下、本発明を具体的に説明する。本発明におけるタイプ1型糖鎖構造のラクトーN-

ビオシド結合のみに特異的に作用するグリコシターゼとしては、*Streptomyces sp. 142* (*Streptomyces sp. 112*) 由来のラクトーN-ビオシターゼ(「*Protein Expr. Purif.*」オックスフォード・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・U.S.A.、第59巻、第8521~8516頁(1992))が挙げられる。該酵素は下記式(化2)で表される糖鎖に作用してラクトーN-ビオシド結合のみを加水分解するという基質特異性が述べられている。

【0010】

【化2】



【0011】しかしこの酵素が糖鎖の転移反応を行う活性を保有していることは知られていない。糖鎖又は複合糖質へのラクトーN-ビオシド転移反応は、本発明者らから初めて見出したものである。また、これらに限定されるものではなく、タイプ1型糖鎖構造のラクトーN-ビオシド結合のみに特異的に作用するグリコシターゼで転移活性を有するものであればオーティフ(Native)な酵素及び遺伝子工学的に得られた酵素、例えば、目的とする酵素をコードする遺伝子をベクターに導入し、該ベクターを宿主(例えば、大腸菌)に形質転換して得られた形質転換体を培養し、該培養物から調製した組換え酵素、目的とする酵素をコードする遺伝子を部位特異的変異導入法等を用いて改変し、ベクターに導入し、該ベクターを宿主(例えば、大腸菌)に形質転換して得られた形質転換体を培養し、該培養物から調製した組換え酵素も本発明のタイプ1型糖鎖構造のラクトーN-ビオシド結合のみに特異的に作用するグリコシターゼに含まれる。

【0012】本発明において、前述の式(化1)中のXは糖質、複合糖質若しくはアグリコンとなりうる化学物質であり、本発明のラクトーN-ビオシターゼを用いる場合、グルコース、マンノース、N-アセチルグリコサミン、ガラクトース、アコース、キシロース、p-ニトロフェニルグリコシド誘導体、メチルグリコシド誘導体等の単糖、これら2単糖以上のホモオリゴマー、これらの2成分以上より成るヘテロオリゴマー等の糖質があり、またその末端にAsnや、Asnを介しポリペプチドが結合した複合糖質、その末端にThr又はSerや、Thr又はSerを介しポリペプチドが結合した複合糖質、ニトロフェニル誘導体、3-インドール誘導体、4-メチルウンデリルフェニル誘導体、チアチル誘導体、1,3,5-トリメチル誘導体等のアグリコンとなりうる化学物質でもよい。また、Yは糖質又は複合糖質であり、本発明のラクトーN-ビオシターゼを用いる場合、グルコース、マンノース、N-アセチルグリコサミン、ガラクトース、アコース、キシロース、p-ニトロフェニルグリコシド誘導体、メチルグリコシド誘導体等の単糖、これらの2単糖以上のホモオリゴマー、これら2成分以

上より成るヘテロオリゴマー等の糖質があり、またその末端にA-Serや、A-Serを全シガリペプチドが結合した複合糖質、その末端にThr又はSerや、Thr又はSerを全シガリペプチドが結合した複合糖質が例示される。特に、Yについては、その非還元末端にC-3位が遊離の糖を有する糖質又は複合糖質を選択することが好ましい。

【0013】本発明の転移反応は、通常、原料の糖質又は複合糖質、ラクトーN-ヒオシダーゼ、及び緩衝液を含む出発溶液に、アクセプターの糖質又は複合糖質を加えて行われる。原料及びアクセプターの使用量は特に制限されず、その飽和量まで使用できるが、アクセプターが過剰に存在する状態が好ましい。通常、200mM以上のアクセプターを使用する。ラクトーN-ヒオシダーゼの使用量も特に制限されず広い範囲から適宜選択できるが、出発溶液1ml当り、通常1mU以上、より好ましくは10mU～100U程度使用すれば良い。緩衝液としては、pHが4～10程度の好適な緩衝液を用いれば良く、通常はpH5付近で酢酸緩衝液中で反応を行うことが好ましい。本発明の転移反応は、出発溶液に有機溶媒、無機塩等を加えて疎水性状態としてもより反応し、有機溶媒として、例えばアセトニトリルを用いれば、水難溶性の糖質又は複合糖質を使用することができ、ラクトーN-ヒオシダーゼの場合、40%のアセトニトリル存在下でもより反応する。本発明の転移反応は、ラクトーN-ヒオシダーゼを用いる場合、通常、室温～60℃程度、好ましくは30～40℃程度の温度下及びpH4～10程度のpH条件下に行われ、その反応条件にもよるが、転移反応は通常5分～60分程度、好ましくは10～40分程度で終了する。本発明の転移反応により生成するリモテリングした糖質又は複合糖質は、公知の手段に従って反応終了液から容易に分離・精製することできる。例えば、ゲル過カラムクロマトグラフィー、イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィー等により反応終了液から、リモテリングした糖質又は複合糖質を分離し、更に濃縮、脱塩、凍結乾燥等を行うことにより得ることができる。

【0014】また、本発明の方法で製造した糖質又は複合糖質は各種糖質分解酵素の基質ともなり、各種有用酵素の検出にも用いることができる。例えば、ラクトーN-ヒオシダーゼの存在下、Glc-X(5-プロモ-4-フロロ-3-インドリル-D-グルコシド)を作用させ、得られるGalβ1-3GlcNAc-Glc-Xは、試料中のラクトーN-ヒオシダーゼの検出及び測定に用いることができる。すなわち試料中の目的の酵素が存在すれば、Glc-Xが遊離し、次にα-ナリジンダーゼを用いれば遊離の5-プロモ-4-フロロ-3-インドールが青色を呈し、アサアインブルーや蛍光計などを必要とせず、試料中の酵素活性を測定することができる。試料としては例えば、微生物培養液、培養

液からの精製物、動物、植物等からの調製物等を用いることができる。

【0015】上述したように、本発明の製造方法を用いることにより、簡便に医薬品である糖タンパク質に糖鎖を付加したり、あるいは既に存在する糖鎖の構造の変更を行うことが可能となり、生体内での安全性や生物活性が従来品に比べて増強された医薬品を得ることが可能となる。特に、糖の転移、浸潤にはタイプ1型糖鎖構造(Galβ1-3GlcNAc)を基本とする糖鎖が関与することが知られており、本発明の製造方法は、これらの糖転移抑制又は阻止のための医薬品の開発に非常に有用である。更に、本発明の製造方法で得られた糖鎖又は複合糖質は、糖質分解酵素の基質として用いることも可能であり、有用糖質分解酵素の検出に有用である。

【0016】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、本発明は以下の実施例の範囲のみに限定されるものではない。

【0017】実施例1 ラクトースへの糖鎖の転移反応

(1) プロシーディングズ オブ サ ナショナル アカデミー オブ サイエンシース オブ サ U S A に記載の方法に従って、ストレプトミセス sp 142を培養し、ラクトーN-ヒオシダーゼを調製し、以下実施例に使用した。該菌株は、Streptomyces sp 142と表示し、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-4569として寄託されている。1Mのラクトース(ナカライテスク社製)の水溶液1.6mlに、50mM酢酸緩衝液(pH4.5)を2.0mlと、ラクトーN-ヒオシダーゼを100mU含む酵素溶液0.2mlを加え、次いで5mM p-ニトロフェニル-β-ラクトーN-ビオシド(ナカライテスク社製)を0.2ml添加し、37℃で30分間反応させた。その後、反応液を100℃にて3分間加熱処理し、反応を停止させた。こうして得られた反応液を凍結乾燥後、特開平1-10177号公報に記載の方法に準じピリジール(2)-アミノ化(以下、PA化と略記する)を行い、HPLCにて精製した。このようにしてPA化された転移生成物であるGalβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc-PAを得た。次にこのPA化物の組成分析、NMR分析を行い、その糖鎖構造がGalβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc-PAであることを確認した。

【0018】(2) 上記(1)と同様の条件で転移反応を行い、反応開始後、20分、40分、60分、120分後にそれぞれをサンプリングし、反応を停止した。こうして得られた反応液を凍結乾燥後、上記(1)と同様にPA化生成物を調製し、その収率を求めた。その結果を図1に示す。すなわち、図1はラクトーN-ヒオシダーゼを用い、p-ニトロフェニル-β-ラクトーN-ビオシドにラクトースを転移させた際の収率を示す図であ

り、横軸に反応時間（分）、縦軸に収率（％）を示す。
図1からわかるように、反応40分後で約3％の収率を示した。

【0019】

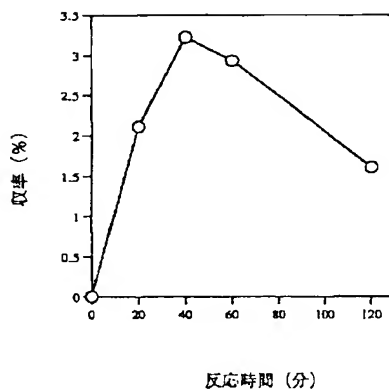
【発明の効果】本発明により、糖質又は複合糖質を直接アクセプターとする、タイプ1型糖鎖を特異的に、かつ1段階の反応で、簡便に行える糖質又は複合糖質のリモデリング方法が提供される。該方法は目的の糖質又は複合糖質を効率良く容易に製造でき、また、副生物の生成

も少なく、目的の糖質又は複合糖質の分離精製も容易であり、生体内で重要な働きを示す生理活性物質の糖鎖をリモデリングした物質の製造において有用である。また、本発明の製造方法で得られた糖質又は複合糖質は、糖質分解酵素の基質として用いることが可能であり、各種有用酵素の検索に有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】ラクトーNービオシダーゼの転移反応時間と収率との関係の1例を示すグラフである。

【図1】



フロントページの続き

(72)発明者 加藤 郁之進

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造

株式会社中央研究所内